

PATENT

Attorney Docket No.: 032301WD205

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Brigitte BATHE, *et al.*)
Serial No.: New 09/942,936) Group Art Unit: Unassigned
Filed: August 31, 2001) Examiner: Unassigned

#10
B.G.
3/20/02

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE sigH GENE

CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY

RECEIVED

MAR 14 2002

TECH CENTER 1600/2900

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Under the provisions of Section 119 of 35 U.S.C., Applicants hereby claim the benefit of German Application No. DE 101 33 427.3 filed in Germany on July 10, 2001 relating to the above-identified United States patent application.

In support of Applicants' claim for priority, a certified copy of said German application is attached hereto.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By: _____

 45, 238

Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531
1850 M Street, N.W., Suite 800
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 659-2811
Facsimile: (202) 263-4329

October 30, 2001

1652



PATENT

Attorney Docket No.: 032301WD205

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Brigitte BATHE, *et al.*)
Serial No.: New 09/942,936) Group Art Unit: Unassigned
Filed: August 31, 2001) Examiner: Unassigned
For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE sigH GENE

TRANSMITTAL LETTER

Commissioner For Patents
Washington, DC 20231

RECEIVED
MAR 14 2002
TECH CENTER 1600/2900

Dear Sir:


Transmitted herewith is:

ITEM(S)	FEE
• Claim for Foreign Priority; and	None
• Certified copy of German Application DE 101 33 427.3	None

☒ No fees are being paid with this filing.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By:  45,338
Robert G. Weilacher - Reg. 20,531
1850 M Street, N.W., Suite 800
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 263-4300
Facsimile: (202) 263-4329

Dated: October 30, 2001

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



#10



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 33 427.3

Anmeldetag: 10. Juli 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Priorität: 02.09.2000 DE 100 43 333.2

IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigH-Gen
5 verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie
10 und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel
15 Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die
20 Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

30 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene

amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue
5 Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,
sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich
10 ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

20 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
25 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
30 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors H aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine

5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

10 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

20 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

25 coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das sigH-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor H kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigH-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu
- 15 detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor H

20 kodieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende
- 25 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150,
- 30 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- 5 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und
10 ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

- Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
15 Aminosäuren enthalten.

- Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors H und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens
20 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

- Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur
25 fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-
30 Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise
5 die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere
10 Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration
15 des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann
20 sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

25 Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
30 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
Mutanten bzw. Stämme.

- 5 Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Sigma-
Faktor H kodierende sigH-Gen von *C. glutamicum* zu
isolieren.

- Zur Isolierung des sigH-Gens oder auch anderer Gene von
C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
10 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
15 Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
20 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032,
die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,
1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
25 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
(1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum*
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

- 30 Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli*
können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,
25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene,
19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich

besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen sigH kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des sigH-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins

führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen

durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigH-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.
- Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode

der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivanan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem sigH-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigH-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen *pyc* (DE-A-198 31 609),
 - das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen *mgo* (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
 - das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC* (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759),
 - das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE* (DE-A-195 48 222),
 - das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom* (EP-A 0131171),
 - das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)* (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
 - das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
 - das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
 - das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *sigH*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

10 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise
15 einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

20 Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration
25 des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sigH*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in:
30 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder
5 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik
10 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
15 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie
20 z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische
25 Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff
30 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie

5 z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die

10 genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

15 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem

20 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise

25 bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

30 Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie

35 kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

5 Folgende Mikroorganismen wurde als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- 10
- Escherichia coli DH5 α mc/pEC-XK99EsigHalex als DSM 14374 am 29. Juni 2001
 - Corynebacterium glutamicum DSM5715/pEC-XK99E als DSM13455 am 17. April 2000.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

15 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)

20 durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

25 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

30 beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI

- (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.
- 15 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.
- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic
5 Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der
10 Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter
15 Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden,
20 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein
offenes Leseraster von 621 Basenpaaren, welches als sigH-Gen bezeichnet wurde. Das sigH-Gen kodiert für ein Protein
25 von 206 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung des Shuttle- Expressionsvektors pEC-XK99EsigHalex zur Verstärkung des sigH-Gens in *C. glutamicum*

30 3.1 Klonierung des sigH-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum*

bekannten Sequenz des sigH-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

sigHex1:

5 5' ca ggt acc-ttt tcg aaa ggg gcc aca tg 3'

sigHex2:

5' tg tct aga-aag aat tca ggg cag cca ca 3'

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der
10 Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit
Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer
15 die Amplifikation eines 712 bp großen DNA-Fragmentes, welches das sigH-Gen trägt. Außerdem enthält der Primer sigHex1 die Sequenz für die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease KpnI, und der Primer sigHex2 die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease XbaI, die in der
20 oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert sind.

Das 712 bp große sigH-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XbaI gespalten und anschließend aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel
25 Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

3.2 Konstruktion des Shuttle - Vektors pEC-XK99E

Nach dem Stand der Technik wurde der E. coli - C. glutamicum Shuttle - Vektor pEC-XK99E konstruiert. Der
30 Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGAl einschließlich des Replikationseffectors per (US-A-5,175,108; Nesvera et al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Kanamycin-Resistenzgen aph(3')-IIa

aus *Escherichia coli* (Beck et al. (1982), Gene 19: 327-336), den Replikationsursprung, den *trc*-Promotor, die Terminationsregionen T1 und T2, das *lacI^q*-Gen (Repressor des *lac*-Operons von *E. coli*) und eine

- 5 Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, *mcs*) (Norrande, J.M. et al. Gene 26, 101-106 (1983)) des Plasmids pTRC99A (Amann et al. (1988), Gene 69: 301-315).

Der *trc*-Promotor kann durch Zugabe des Lactose-Derivates IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert werden.

- 10 Der konstruierte *E. coli* - *C. glutamicum* Shuttle - Vektor pEC-XK99E wurde mittels Elektroporation (Liebl et al., 1989, FEMS Microbiology Letters, 53:299-303) in *C. glutamicum* DSM5715 transferiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5
15 g/l Brain-Heart Infusion Bouillon, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

- Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen
20 Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

- 25 Das so erhaltene Plasmidkonstrukt wurde als pEC-XK99E (Figur 1) bezeichnet. Der durch Elektroporation des Plasmides pEC-XK99E in den *C. glutamicum*-Stamm DSM5715 erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99E genannt und als DSM13455 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und
30 Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

3.3 Klonierung von sigH in den E. coli-C. glutamicum Shuttle Vektor pEC-XK99E

Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor pEC-XK99E verwendet. DNA

- 5 dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert.
- 10 Das in Beispiel 3.1 beschriebene, mittels PCR gewonnene und mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XbaI gespaltene ca. 700 bp große sigH-Fragment wurde mit dem vorbereiteten Vektor pEC-XK99E gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 15 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 α mc^r (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen
- 20 erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit
- 25 (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit den Restriktionsenzymen XbaI und KpnI gespalten, um das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wurde pEC-XK99EsigHalex genannt. Es ist in Figur 2
- 30 dargestellt.

Beispiel 4

Transformation des Stammes DSM5715 mit dem Plasmid
pEC-XK99EsigHalex

Der Stamm DSM5715 wurde mit dem Plasmid pEC-XK99EsigHalex
5 unter Anwendung der von Liebl et al., (FEMS Microbiology
Letters, 53:299-303 (1989)) beschriebenen
Elektroporationsmethode transformiert. Die Selektion der
Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5
g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l
10 Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und
18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert
worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen
Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998,
15 Microbiology, 144, 915 - 927), mit den
Restriktionsendonukleasen XbaI und KpnI geschnitten und das
Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese
überprüft. Der erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-
XK99EsigHalex1 genannt.

20 Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm
DSM5715/pEC-XK99EsigHalex wurde in einem zur Produktion von
Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt
25 im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem
entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin
(25 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von
dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10
30 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die
Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

5 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
 (NH ₄) ₂ SO ₄	 25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
L-Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die
5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO₃.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) und IPTG (1mM/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte
10 bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	6,9	13,26
DSM5715/pEC- XK99EsigHalex	10,0	14,25

10

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Karte des Plasmids pEC-XK99E

Figur 2: Karte des Plasmids pEC-XK99EsigHalex

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

15

Kan:	Kanamycin Resistenz-Gen aph(3')-IIa aus Escherichia coli
HindIII	Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII
XbaI	Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI
KpnI	Schnittstelle des Restriktionsenzym KpnI
P _{trc}	trc-Promotor
T1	Terminationsregion T1
T2	Terminationsregion T2

per	Replikationseffektor per
rep	Replikationsregion rep des Plasmides pGA1
lacIq	lacIq-Repressor des lac-Operons von Escherichia coli
sigH	kloniertes sigH-Gen

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000447 BT

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1148

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (302)..(919)

<223> sigH-Gen

25

<400> 1

ttgttgatgg ctgtggctaa atcatcgta tctttggggc gtaatcgatg ccaaaatgcg 60

30

agggtcacqgc gattagtctc aacaatttcg gtgcttaaag gatcctgctg attattgacg 120

gtgaagtaga acattgtttc cccctagatt tgaagtggta catatgttct aactgatgtg 180

gtggacacgc gggggtagag taaagtctaa gcaacagctc acgtggcttt acagctaccc 240

35

ccgaaaggtc tgttttttat cggaagtaga atagtcaaca cgcatttttcg aaaggggccca 300

c atg gct gaa aac cga acc ggc aca gtc gat gga gac gcg ttg gct gcc 349

Met Ala Glu Asn Arg Thr Gly Thr Val Asp Gly Asp Ala Leu Ala Ala

1

5

10

15

40

cgc ttt gaa gag gag gca ctg cca ctc ctt gac cag ctc tat ggc ggt 397

Arg Phe Glu Glu Glu Ala Leu Pro Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Gly Gly

20

25

30

45

gct ctg cgc atg act aga aat ccc gca gat gcg gaa gat ctc gtg caa 445

Ala Leu Arg Met Thr Arg Asn Pro Ala Asp Ala Glu Asp Leu Val Gln

35

40

45

50

gac acc tat atc aag gcg tac cag gcg ttc gcg agc ttc aaa cca ggc 493

Asp Thr Tyr Ile Lys Ala Tyr Gln Ala Phe Ala Ser Phe Lys Pro Gly

50

55

60

55

acc aac ctg aag gct tgg ctc tat cgg atc atg acg aat acc tac atc 541

Thr Asn Leu Lys Ala Trp Leu Tyr Arg Ile Met Thr Asn Thr Tyr Ile

65

70

75

80

aac atg tac cga aag aaa cag agg cag cca tcg caa acc tct gcc gat 589

Asn Met Tyr Arg Lys Lys Gln Arg Gln Pro Ser Gln Thr Ser Ala Asp

85

90

95

gag atc act gac tac cag ctc gtt gaa tct caa tcg cat acc tca aca 637
 Glu Ile Thr Asp Tyr Gln Leu Val Glu Ser Gln Ser His Thr Ser Thr
 100 105 110
 5
 ggg ctg gaa tcc gcc gag gtt gag gct ctg aaa aat ctg cca gac gga 685
 Gly Leu Glu Ser Ala Glu Val Glu Ala Leu Lys Asn Leu Pro Asp Gly
 115 120 125
 10
 aaa att ggc gat gca atg aat caa ctc agc ccg gaa tac cgg atg gtg 733
 Lys Ile Gly Asp Ala Met Asn Gln Leu Ser Pro Glu Tyr Arg Met Val
 130 135 140
 15
 gtt tat tat gcc gat gta gaa gat ctc gca tac aaa gaa atc gcc gag 781
 Val Tyr Tyr Ala Asp Val Glu Asp Leu Ala Tyr Lys Glu Ile Ala Glu
 145 150 155 160
 20
 atc atg gac gtt cca ctc gga act gtg atg tcc cga ctc cat cgt gga 829
 Ile Met Asp Val Pro Leu Gly Thr Val Met Ser Arg Leu His Arg Gly
 165 170 175
 25
 aga aaa cag ctc cga gga atg tta aag gaa gta gcg aag gaa caa ggc 877
 Arg Lys Gln Leu Arg Gly Met Leu Lys Glu Val Ala Lys Glu Gln Gly
 180 185 190
 att ggt ctt gaa cat ccc gac atg aag aaa aat tcg gag gca 919
 Ile Gly Leu Glu His Pro Asp Met Lys Lys Asn Ser Glu Ala
 195 200 205
 30
 taacgatgac gaatctcaac cgcagcgact cgcaaggatga ttgtggctgc cctgaattct 979
 tcgatgaaat gtatcagcta ctgcacgatc aactcagcga gtccgcctgc gagcgtctgc 1039
 35
 ggattcacgc ggcaggctgc ccggcatgcc agcaactgct agaggccgaa tcggagtttc 1099
 gtagtctgtt gcgcaagtgc tgctgcgaat cggcacctgt ggagctccg 1148
 40
 <210> 2
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 45
 <400> 2
 Met Ala Glu Asn Arg Thr Gly Thr Val Asp Gly Asp Ala Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Arg Phe Glu Glu Glu Ala Leu Pro Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Gly Gly
 20 25 30
 50
 Ala Leu Arg Met Thr Arg Asn Pro Ala Asp Ala Glu Asp Leu Val Gln
 35 40 45
 55
 Asp Thr Tyr Ile Lys Ala Tyr Gln Ala Phe Ala Ser Phe Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Asn Leu Lys Ala Trp Leu Tyr Arg Ile Met Thr Asn Thr Tyr Ile
 65 70 75 80

	Asn Met Tyr Arg Lys Lys Gln Arg Gln Pro Ser Gln Thr Ser Ala Asp	85	90	95
5	Glu Ile Thr Asp Tyr Gln Leu Val Glu Ser Gln Ser His Thr Ser Thr	100	105	110
	Gly Leu Glu Ser Ala Glu Val Glu Ala Leu Lys Asn Leu Pro Asp Gly	115	120	125
10	Lys Ile Gly Asp Ala Met Asn Gln Leu Ser Pro Glu Tyr Arg Met Val	130	135	140
	Val Tyr Tyr Ala Asp Val Glu Asp Leu Ala Tyr Lys Glu Ile Ala Glu	145	150	155
15	Ile Met Asp Val Pro Leu Gly Thr Val Met Ser Arg Leu His Arg Gly	165	170	175
20	Arg Lys Gln Leu Arg Gly Met Leu Lys Glu Val Ala Lys Glu Gln Gly	180	185	190
	Ile Gly Leu Glu His Pro Asp Met Lys Lys Asn Ser Glu Ala	195	200	205
25				
	<210> 3			
	<211> 28			
	<212> DNA			
30	<213> Künstliche Sequenz			
	<220>			
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer			
35	sigHex1			
	<400> 3			
	caggtacctt ttcgaaaggg gccacatg			
40	<210> 4			
	<211> 28			
	<212> DNA			
	<213> Künstliche Sequenz			
45	<220>			
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer			
	sigHex2			
	<400> 4			
50	tgtctagaaa gaattcaggg cagccaca			

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors H aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur
5 Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung von
10 Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das sigH-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
9. Escherichia coli Stamm DH5 α mcrr/pEC-XK99E sigHalex als DSM 14374 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig,
20 Deutschland.
10. Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99E als DSM13455 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland.
- 25 11. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere Lysin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
30 produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das sigH-Gen oder dafür kodierende

Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;

- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- 5 c) Isolierung der L-Aminosäure.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
10 verstärkt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
15 gewünschten L-Aminosäure verringern.
14. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das sigH-Gen kodierende
20 Nukleotidsequenz trägt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das sigH-Gen
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
25 überexprimiert.
16. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids
(Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sigH
30 kodiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 5
- 17.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 17.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 10
- 17.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen tpi,
- 17.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen pgk,
- 17.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,
- 15
- 17.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 17.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen mqo,
- 20
- 17.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 17.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 17.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen hom,
- 25
- 17.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen
ilvA oder das für eine feed back resistente
Threonin-Dehydratase kodierende Allel
ilvA(Fbr),

- 17.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase
kodierende Gen *ilvBN*,
- 17.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase
kodierende Gen *ilvD*,
- 5 17.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1*
verstärkt bzw. überexprimiert.
18. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 10 18.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen *pck*,
- 15 18.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen *pgi*,
- 18.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 18.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*
abschwächt.
19. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 20 20. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 11-
18, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß
man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*
einsetzt.
- 25 21. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man den
Corynebacterium glutamicum Stamm DH5 α mcr/pEC-
XK99EsigHallex einsetzt.

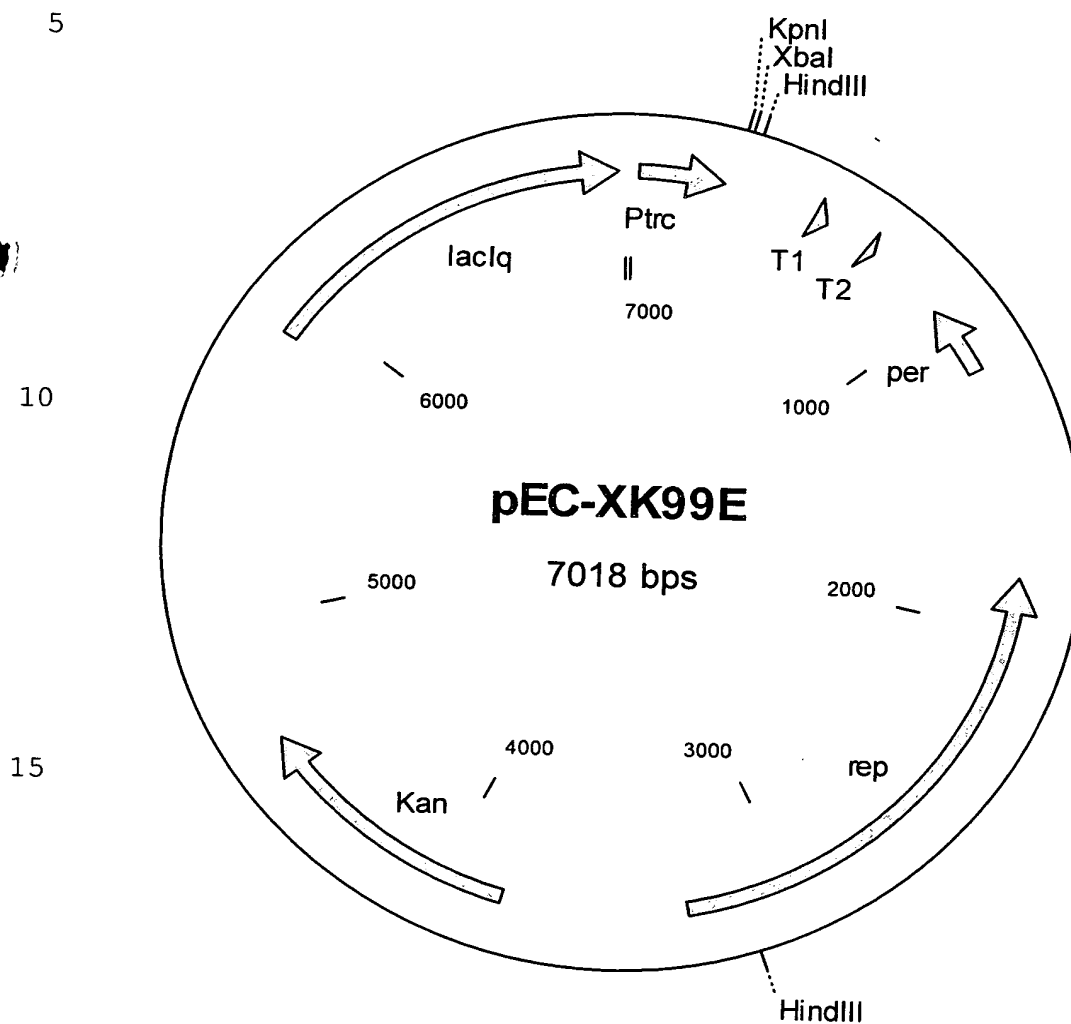
22. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man den
Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99E
einsetzt.
- 5 23. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für den Sigma-Faktor H kodieren oder
eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des sigH-Gens
aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
10 daß man das Polynukleotid, enthaltend die
Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4
als Hybridisierungssonden einsetzt.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro
15 arrays oder DNA-chips einsetzt.

Zusammenfassung

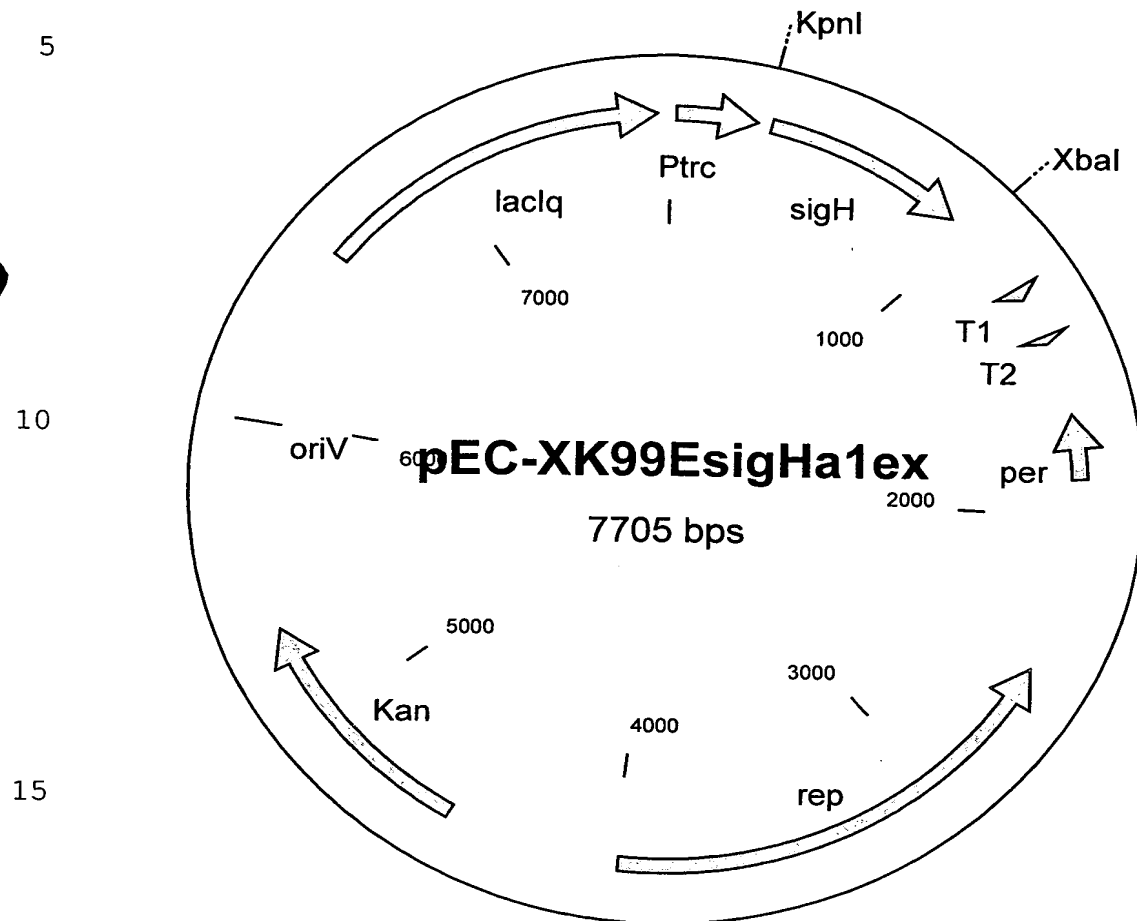
Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigH-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Karte des Plasmides pEC-XK99E



Figur 2: Plasmid pEC-XK99EsigHalex





Creation date: 09-15-2003
Indexing Officer: HNGUYEN32 - HUNG NGUYEN
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 09942936

Legal Date: 12-18-2001

No.	Doccode	Number of pages
1	A...	1
2	REM	1
3	LET.	4
4	XT/	1
5	SEQLIST	3
6	OATH	2
7	CRFL	1

Total number of pages: 13

Remarks:

Order of re-scan issued on